

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

С.Г.Стёпин, О.С.Стёпина, Р.А.Родионова<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВИТАМИНОВ - АНТИОКСИДАНТОВ ДИЛАТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Витебский государственный университет

<sup>1</sup>Витебский государственный медицинский университет

*Показана возможность оценки качества витаминов - антиоксидантов при помощи дилатометрического метода. Определены кинетические параметры, характеризующие антирадикальную активность витамина А, витамина Е и препарата «Аевит». Обнаружена высокая антирадикальная активность витамина А и препарата «Аевит».*

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование радикально-цепных процессов представляет значительный интерес для медицины и фармации. При помощи радикально-цепных реакций синтезируют биомедицинские полимеры, которые используют в хирургии: полимерные пленки с антибактериальными свойствами и пленки, непрерывно выделяющие лекарственные вещества в течение длительного времени.

Радикально-цепные реакции, протекающие в лекарственных формах при хранении, приводят к их порче. Это вызывает необходимость исследования факторов, влияющих на эти процессы, и разработки методов стабилизации лекарственных средств.

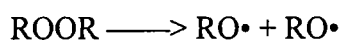
Радикально-цепные процессы, происходящие в организме человека, способствуют развитию различных заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и мозга, злокачественные новообразования, паркинсонизм, диабет, профессиональные и алиментарные заболевания, бронхиальная астма, отравления, лучевая болезнь. В медицинской практике находят применение природные и синтетические антиоксиданты, подавляющие или снижающие действие свободных радикалов в организме человека: витамины (А, Е, С), катехины, дибунол, пробукол, эмоксипин, этамзилат [5].

Существующие методы анализа витаминов - антиоксидантов имеют ряд недостатков, в связи с чем непрерывно разрабатываются новые методы их контроля [3,4].

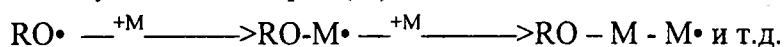
Для контроля качества гетероциклических антиоксидантов нами ранее был использован дилатометрический метод [6]. Этот метод используется в химии полимеров для оценки антирадикальной активности стабилизаторов полимерных материалов. Сущность метода заключается в измерении скорости полимеризации мономеров в присутствии инициаторов полимеризации без стабилизаторов и с добавками последних. Поскольку при полимеризации мономеров наблюдается уменьшение объема системы, то скорость полимеризации можно рассчитать, регистрируя изменение объема с течением времени [7].

Радикально-цепная полимеризация мономеров включает в себя следующие основные элементарные стадии.

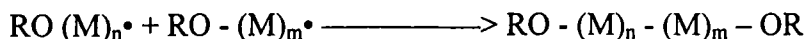
Реакция инициирования цепей, например, за счет распада пероксидов:



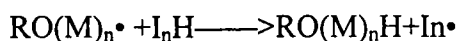
Реакция роста цепей за счет взаимодействия образовавшихся свободных радикалов (RO) с молекулами мономеров (M):



Реакции квадратичного обрыва цепей:



При наличии ингибиторов (InH) происходит обрыв цепей на молекулах ингибиторов по реакции:



Целью данной работы является разработка методик оценки качества витаминов - антиоксидантов при помощи dilatометрического метода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали dilatометры с объемом рабочей ячейки 2-5 мл, цена деления 0,001 мл, что обеспечивало измерение конверсии стирола 0,05-0,1%.

Измерение проводили в ультратермостатах UTU - 2/77 (Польша) при 90, 100°C, колебания температуры не превышали  $\pm 0,05^\circ\text{C}$ .

В качестве мономера использовали стирол Ангарского завода химреактивов ТУ 6-09-11-2034-87, который был очищен промывкой 10%-ным раствором NaOH, водой очищенной до нейтральной реакции по фенолфталеину, сушкой над безводным хлоридом кальция и перегонкой в вакууме, Т. кип. 36°C /11 мм рт. ст.

В качестве инициатора применяли пероксид дикумила ТУ 3840255-83.

- Витамин А (ретинола ацетат) фирмы «Мюльенхэни» (Германия), используемый для витаминизации продуктов детского питания, содержание витамина А в 1 мл масляного раствора 1,5 миллиона МЕ.

- Витамин Е (α-токоферола ацетат), используемый для витаминизации продуктов детского питания, 30%-ный масляный раствор.

- «Аевит» в капсулах производства «Минскинтеркапс», содержащий 100000 МЕ ретинола пальмитата и 0,1 г токоферола ацетата в 0,2 г масляного раствора. Витамины А и Е, входящие в состав «Аевита», произведены фирмой «Хофман Ля Рош» (Швейцария).

Для dilatометрических измерений скоростей полимеризации готовили 0,05 М растворы пероксида дикумила в стироле без витаминов и растворы, в которые добавлены витамины А и Е. Концентрация витаминов А и Е  $4,13 \cdot 10^{-3}$  моль/л, навески масляных растворов из капсул «Аевита» брали таким образом, чтобы суммарная концентрация витаминов А и Е также составляла  $4,13 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

Кинетические кривые полимеризации стирола, инициированной пероксидом дикумила, описываются линейной зависимостью как в отсутствие витаминов - антиоксидантов, так и при наличии последних (рис. 1).

Расчет скоростей полимеризации проводили методом наименьших квадратов на ЭВМ по формулам:

$$\omega_n = \frac{\sum p_i \cdot t_i}{\sum t_i^2};$$

$$d_i = p_i - \omega_n \cdot t_i;$$

$$(\Delta\omega_n)^2 = \frac{1}{\sum t_i^2} \cdot \frac{\sum d_i^2}{N-1},$$

где Р - конверсия стирола (моль/л);

$\omega_n$  - скорость полимеризации (моль/л·с);

t - время (с);

N - число экспериментальных точек.

Расчет констант скоростей полимеризации и констант скоростей инициирования полимеризации проводили по формулам:

$$K_n = \frac{\omega_n}{[I]^{0,5}[M]},$$

где  $K_n$  - константа скорости полимеризации (моль/л·с),  
 $[I]$  - концентрация пероксида (моль/л).

$$K_{ei} = \frac{\hat{E}_n^2}{(\hat{E}_\delta / \hat{E}_i^{0,5})^2},$$

где  $K_{ин}$  - константа скорости инициирования полимеризации ( $c^{-1}$ ),  
 $K_p$  - константа скорости роста цепи (л/моль·с),  
 $K_o$  - константа скорости обрыва цепи (л/моль·с).

Отношение констант  $K_p/K_o^{0,5}$  для стирола вычисляли по формуле [2]:

$$K_p/K_o^{0,5} = 380 \exp(-6500/RT) \text{ (л}^{0,5}/\text{моль}^{0,5} \cdot \text{с}^{0,5}\text{)}.$$

Для оценки антирадикальной активности витаминов — антиоксидантов можно сравнивать скорости полимеризации или константы скорости полимеризации стирола без витаминов и с добавками последних.

Более объективной характеристикой качества витаминов является величина  $fK_7$ , где  $K_7$  - константа скорости обрыва цепи на ингибиторе (л/моль·с),  $f$ -коэффициент, показывающий, сколько цепей обрывает одна молекула ингибитора.

Расчет  $fK_7$  проводили по уравнению:

$$\frac{\omega_n}{\omega_{n7}} = \frac{fK_7[InH]}{K_o^{0,5} \cdot K_e^{0,5} \cdot [I]^{0,5}},$$

где  $\omega_n$  - скорость полимеризации без витаминов (моль/л·с);  
 $\omega_{n7}$  - скорость полимеризации с добавками витаминов (моль/л·с);  
 $[InH]$  - концентрация витаминов (моль/л).

Значения  $K_o$  рассчитывали по формуле [8]:

$$K_o = 10^{7,9} \exp(-2000/RT) \text{ л/моль} \cdot \text{с}.$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее для определения антирадикальной активности гетероциклов нами использован традиционный инициатор 2,2<sup>1</sup> – азо - бисизобутиронитрат (АИБН) [6]. Однако его применение в качестве инициатора при проведении dilatометрических измерений имеет ряд недостатков. АИБН неустойчив при хранении и для достижения стабильных результатов его необходимо подвергать трехкратной перекристаллизации. Кроме того, разложение АИБН сопровождается выделением азота, попадание которого в измерительный капилляр делает невозможным проведение измерений. В связи с этим нами впервые для этой цели в качестве инициатора был выбран пероксид дикумила, распад которого происходит без образования газообразных продуктов, затрудняющих проведение dilatометрических измерений. Кроме этого, пероксид дикумила является одним из наиболее устойчивых инициаторов полимеризации.

Обработкой кинетических кривых полимеризации (рис. 1) по вышеуказанному алгоритму были рассчитаны кинетические параметры полимеризации: скорости полимеризации, константы скоростей полимеризации, значения  $fK_7$ , которые являются величинами, характеризующими антирадикальную активность и в конечном счете качество витаминов - антиоксидантов.

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Кинетические параметры полимеризации стирола

№	Витамин	t, C	$\omega_n$ , л/моль·с	$K_n$ , л/моль·с	$fK_7$ , л/моль·с
1	Ретинола ацетат	90	$3,17 \cdot 10^{-5}$	$1,75 \cdot 10^{-5}$	832
2	Ретинола ацетат	100	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$6,98 \cdot 10^{-5}$	1005
3*	$\alpha$ -токоферола ацетат	90	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$8,31 \cdot 10^{-5}$	-
4	$\alpha$ -токоферола ацетат	100	$4,00 \cdot 10^{-4}$	$2,22 \cdot 10^{-4}$	-
5	Аевит	90	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$6,27 \cdot 10^{-5}$	232
6**	Без витаминов	90	$1,36 \cdot 10^{-4}$	$7,46 \cdot 10^{-5}$	-
7	Без витаминов	100	$3,28 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-4}$	-

Примечание: \* В опытах 3,4 константы  $fK_7$  не рассчитывались в связи с отсутствием ингибирования.

\*\* В опытах 6,7 измерения скоростей полимеризации проведено без добавок витаминов в присутствии 0,05 моль/л пероксида дикумила.

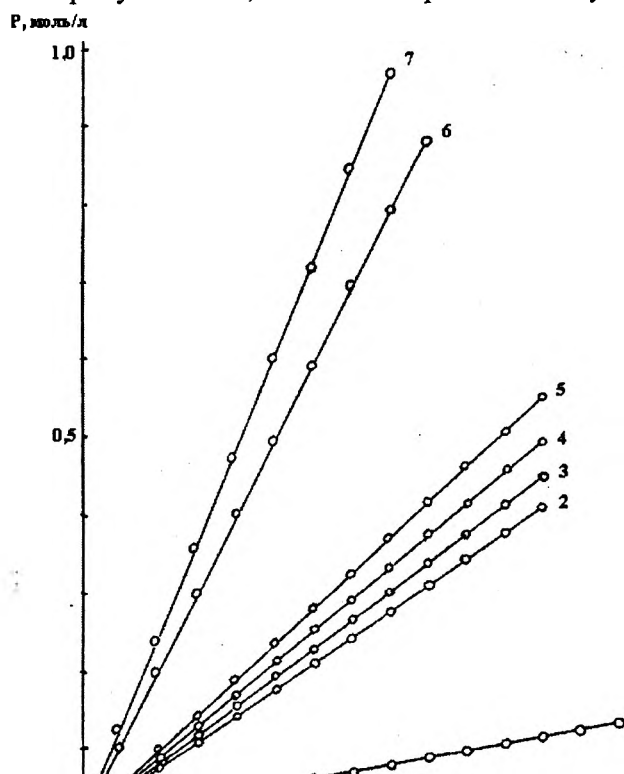


Рис. 1. Кинетические кривые полимеризации стирола в присутствии витаминов - антиоксидантов.

1 – ретинола ацетат 90°C; 2 - Аевит 90°C; 3 – ретинола ацетат 100°C; 4 - пероксид дикумила 90°C, 5 – токоферола ацетат 90°C; 6 - пероксид дикумила 100°C; 7- токоферола ацетат 100°C.

Как видно из графиков (рис. 1) и данных таблицы 1, ретинола ацетат проявляет выраженную антирадикальную активность по отношению к свободным радикалам, образующимся при полимеризации стирола. Значения скоростей полимеризации и констант скоростей полимеризации стирола уменьшаются в 2,6-4,3 раз при введении в полимеризующую систему ретинола ацетата.

Неожиданным оказалось то, что  $\alpha$ -токоферола ацетат, который является признанным биологическим антиоксидантом [1], не проявил антирадикального действия в процессе полимеризации стирола. Скорость полимеризации стирола при добавлении  $\alpha$ -токоферола ацетата несколько возросла (в 1,1 - 1,2 раза).

Ранее нами показано при исследовании азот- и серосодержащих гетероциклов при помощи дилатометрического метода и метода ингибирования, что антирадикальная и антиоксидантная активность гетероциклов коррелируют между собой [6].

При полимеризации стирола в присутствии «Аевита», который содержит почти в 2 раза меньше ретинола пальмитата, чем витамина Е (концентрация ретинола пальмитата в исследуемом растворе -  $1,37 \cdot 10^{-3}$  моль/л), значение  $fK_7$  составляет 232 л/моль·с.

Предположив, что витамин А и витамин Е не влияют друг на друга в процессе полимеризации и отсутствует синергизм и антагонизм, мы произвели расчет значения  $fK_7$  для ретинола пальмитата в «Аевите». Полученное значение  $fK_7$  составило 780 л/моль·с. Несмотря на то, что для этого исследования использовали витамин А разных производителей, в раз-

личных маслах, при разной концентрации, получены близкие значения  $k_7$  для ретинола ацетата и ретинола пальмитата, содержащего в «Аевите» - 832 и 780 л/моль·с соответственно.

Проведена приблизительная оценка температурной зависимости  $k_7$  для ретинола ацетата.

$$k_7 = 9,6 \cdot 10^5 \exp (-21300/RT).$$

Дилатометрический метод позволяет моделировать поведение веществ при их хранении, особенно при повышенной температуре, при освещении, действии радиации и других процессах, при которых возможно образование свободных радикалов R.

Поскольку при помощи дилатометрического метода можно определять антирадикальную активность и в конечном счете качество исследованных витаминов, данный метод является перспективным для определения сроков годности лекарственных форм, содержащих витамины.

### ВЫВОДЫ

1 Предложен дилатометрический метод оценки качества витаминов А, Е и лекарственного средства «Аевит» путем измерения скоростей полимеризации стирола, инициированной пероксидом дикумила.

2 Рассчитаны кинетические параметры полимеризации стирола в присутствии вышеуказанных препаратов, характеризующие их качество.

3. Обнаружена высокая антирадикальная активность витамина А и содержащих его лекарственных средств.

4 Установлено возрастание скорости полимеризации стирола при введении в систему витамина Е.

Работа выполнена при финансовой поддержке межвузовского фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь по программе «Метрология и качество» - «Исследование дилатометрических методов для оценки качества органических соединений»

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Абрамова Ж.И., Оксенгенялер Г.И. Человек и противокислительные вещества. Л. Наука, 1985.

2. Багдасарьян Х.С. Теория радикальной полимеризации М. Наука, 1966, с. 300.

3. Варинский Б.А., Петренко В.В. а) Применение солей диазоля в фармацевтическом анализе, б) Количественное определение аскорбиновой кислоты. Вестник фармации 1998, № 2-3, с. 47-49.

4. Лутцева А.И., Маслов Л.Г., Евтушенко Н.С., Середенко В.И. Совершенствование методов контроля качества и стандартизации  $\alpha$ -токоферола ацетата. Вестник фармации. 1998, №2-3, с. 43-46.

5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей, т.2. Харьков «Торсинг», 1997. с. 592.

6 Степин С.Г., Опарин Д.А., Степина О.С. Исследование антирадикальной и антиокислительной активности некоторых азот- и серосодержащих гетероциклов. 1-ая Всероссийская конференция по химии гетероциклов памяти А.Н. Коста. Суздаль, 2000, с. 361.

7. Степин С.Г., Степина О.С. Дилатометрический метод контроля качества пероксидов. Разработка импортозамещающих технологий и материалов в химической промышленности. Материалы конференции. Минск: БГТУ, 1999, с. 371-373

8 Степин С.Г., Чирко А.И., Тищенко И.Г. Иницирующая активность ацетиленовых гидроперекисей процесса полимеризации стирола. Вести АИ БССР, сер. хим. наук 1979, №5, с. 81-84.